

肉製品のキュアリング温度における Actomyosin の変性について

鎌 田 寿 一

(昭和 33 年 6 月 30 日 受 理)

Denaturation of Actomyosin in meat Products on the Temperature of Curing.

JUICHI KAMADA

いわゆる肉製品（ハム、ペーコン、ソーセージ）中には、食塩が 2.5~5.0% (w/w) 程度含まれている。これは人類が長期間にわたる食生活史の中で経験的に会得した適正塩濃度であり、味覚及び製品の良好な状態はこの塩濃度においてのみ可能である。殊に興味ある事実は近年肉製品中最も需要の多いソーセージスタイルの製造において、食塩含量が製品の結着性、保水性に重大な関連を有することが明らかになってきたことである。

すなわち、ソーセージの製品として必要な弾力性及び保水性は食塩含量 2.5~3.0% (w/w) の範囲内で最も良好であることが報告されている^{1) 3)}。

食塩含量がこれ以下の場合には製品はもろくなり、且水分及脂肪を分離し、製品として、不適当となる。このような事実は筋肉蛋白質中前記の塩濃度で可溶となる蛋白質が接着剤 (cementing substance) としての効果を果していることを強く暗示している。筋肉構造蛋白質中上記の塩濃度で始めて可溶となってくるものは現在生化学の分野で筋肉収縮蛋白質として、問題となっている actomyosin である。従って食品化学的な面からこの蛋白質の重要性を指摘した^{2) 4) 5) 6) 7) 8)} 報告もかなりみられるが、末だその蛋白質の機能の変化と関連した本質的な点に関しては殆んど明らかにされていない。

著者は、生筋から分離した myosin B (natural actomyosin) を肉製品のキュアリング温度 (4°C) に貯蔵した場合の物理化学的变化を検討し、併せて、原料肉中のこの蛋白質の酵素活性の変化と製品の状態との関連について試験した。

その結果、原料肉の酵素活性のみでは混在するミトコンドリアの影響によりその製品の良否との関連については判然とした結果が得られなかったが、myosin B はキュアリング温度で貯蔵した場合かなりゆっくりではある

が、変性した場合の分子中の変化は myosin B を構成している myosin の部分に現われることが判明したのでここに報告する。

実 験 材 料

使用した原料はすべて家兎筋肉である。myosin B はこれらの筋肉から Szent-Györgyi の方法に従い、Weber-Edsall 溶液で抽出、精製して用いた。

ATP は家兎のアルコール乾燥筋を Kerr 法¹⁰⁾によって Ba-塩として単離し、使用に際しては K-塩とした。

実験方法及び結果

1) アデノシントリフォスファターゼ活性(ATPase)

myosin B の ATPase 作用は次の如く測定した。すなわち、反応液 9.0ml (myosin B 適当量、KCl 濃度 0.6M tris-maleate buffer $\frac{1}{20}$ M, CaCl₂ 濃度 10mM) を 20°C の恒温槽中で 5 分間インキュベートしこれに 10 mM アデノシン 3 磷酸の K-塩 (ATP) を 1 ml 吹込み一定時間毎に、2ml をとり同容の 10% 過塩素酸中に吹込んで反応をとめ、沈殿した蛋白質を乾燥した濾紙で濾過する。その濾液について、遊離した P 量を Fiske-Subbarow の方法で比色定量した。測定時の pH は 6.9 である。ATP 濃度は 1N 塩酸中 100°C 8 分加水分解して遊離する無機オルト磷酸を ATP 中の 2P であるとして計算した。蛋白質量はマイクロキールダール法で窒素を定量し、6 を乗じて算出した。キュアリング温度 (4°C) に貯蔵した場合 myosin B の ATPase の減少度合を測定すると、第一図のように 30 日間の貯蔵で極めてゆっくりとした失活度合を示す。この事実は、蛋白質一般がそうであるように、低温ではかなり安定であることを示している。然しながら、貯蔵の際にその pH を乳酸で低

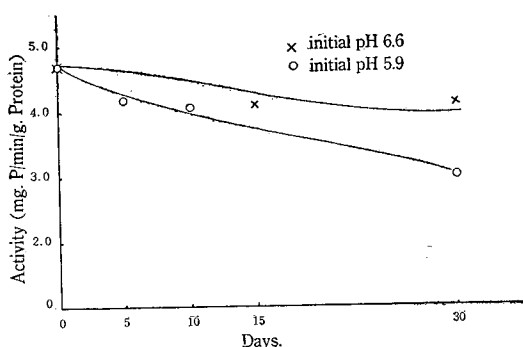


Fig 1. キュアリング温度で貯蔵した myosin B の ATPase の変化

く下げたものの方がより失活の度合いが多いことも同時に示されている。

2) ATP 添加による粘度の低下

myosin B の 0.6M KCl 溶液に 1mM の $MgCl_2$ の存在下で ATP を加えると急激な粘度低下がみられる。Ostwald の粘度計を用いて、H. H. Weber 及び H. Portzehl¹¹⁾ の

$$ATP\text{ sensitivity} = \frac{Z\eta - Z\eta_{ATP}}{Z\eta_{ATP}} \times 100$$

の変化を (1) の ATPase の変化と同時に測定すると、第 2 図の如くである。ここに $Z\eta = \frac{\ln \eta_{rel}}{C}$, C = 蛋白量である。第 2 図の結果は殆んど第 1 図の ATPase の

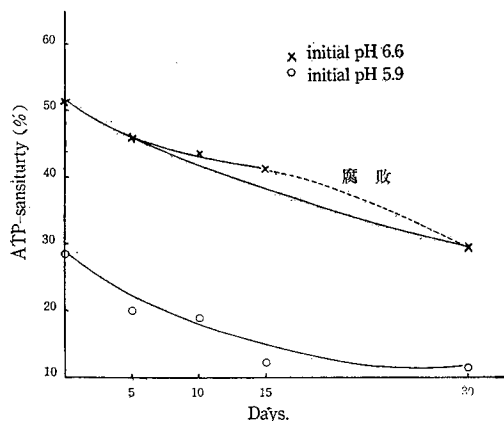


Fig 2. キュアリング温度で貯蔵した myosin B の ATP sensitivity の変化

変化と同様な傾向を示し、myosin B 中の actin と myosin との結合力が蛋白質の変性と共に弱まって行くことを示している。又貯蔵時の pH の影響も第 1 図と全く同様である。myosin と actin の調製法や、その他の諸性質

から考えて、actin は ATPase 作用を示さず且割合安定であるので、myosin B の変性の際には分子中の myosin の変性が主体になっていると想像される。

3) 硫安による塩析

よく知られているように myosin B の塩析曲線は硫安飽和度 26~32% の範囲に actomyosin, 38~42% の範囲に myosin の存在を示す^{12) 13)} 又 myosin B-ATPase はその分子中の myosin によっており、著者の得た前述の結果はこの myosin の部分が変化をうけるらしいことを示している。これを更に明確にする目的で硫安による塩析を行った。

方法は Derrien¹⁴⁾ の記載に従い、実験条件は Snellmann 及び Tenow¹⁵⁾ のそれと殆んど同じである。すなわち緩衝液 (0.5M KCl, 0.1M 磷酸緩衝液 pH=7.0) を含む飽和硫安液 (pH=7.0) を 5°C で調製し、この硫安液及び緩衝液より異った量の硫安を含む一連の溶液を作製した。この液 5ml に 0.5ml の蛋白溶液 (0.6M KCl) を加え、1°C でこの混液を 18 時間静置した。次にこの液を冷室中で濾過し、濾液についてその蛋白濃度を Folin のフェノール試薬¹⁶⁾ で測定した。

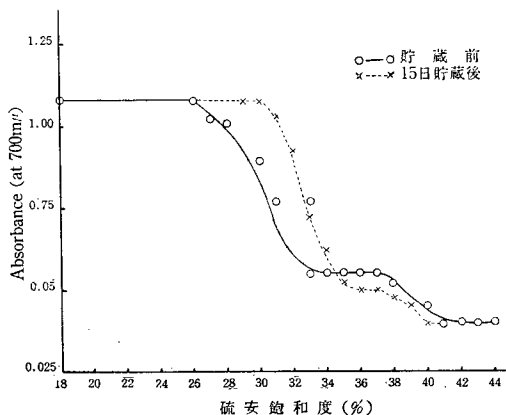


Fig 3. キュアリング温度で貯蔵した myosin B の 硫安塩析曲線の変化 (pH. 5.9)

この結果は第 3 図に示す通りで、貯蔵前の新鮮なサンプルは典型的な myosin B の塩析曲線を示している。これが 15 日間の貯蔵によって、その myosin の部分が変化減少して行くことを示している。この事は明らかに、myosin B 分子中の myosin の部分が貯蔵によって変性することを物語っている。

4) 貯蔵肉中の ATPase 活性の変化

これまでの結果で、myosin B はキュアリング温度でゆっくりではあるが変性して行くことが判明したので、屠殺直後の兎肉を 4°C の冷蔵庫中に保存して、その筋

肉のホモジネートについて ATPase の変化と pH の変化を測定した。

筋肉ホモジネートは細切した肉片 10g に 20ml の蒸留水を加えてガラスホモジナイザーで調製した。

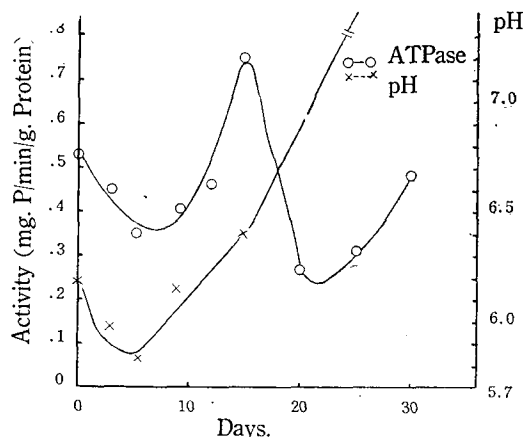


Fig 4. キアリング温度で貯蔵した原料肉中の ATPase の変化

ATPase の測定方法は (1) で述べた方法に従って行なった。pH はガラス電極 pH メーターを使用して測定した。第 4 図に示すように、筋肉ホモジネートの ATPase は屠殺直後一定の間は徐々に減少し、貯蔵中の myosin B と同様の傾向を示すが、同図に同時に示した pH 値の変化からも判るように、腐敗及び自己消化の進行に伴い再び増加し、もとの値よりも高い値を示すようになる。このことは抽出精製された酵素蛋白質と異り、筋肉組織のホモジネートはより複雑な酵素系の変化を辿るものと推定され、抽出した単一酵素系と同様に取扱うことの危険性を示している。又この場合に貯蔵した原料肉から測定したソーセージを常法により製造したが、その結着性保水性は最後まで失われなかった。myosin B の軽度の変性度合より考えてこの結果は当然であると考えられる。

6) 筋肉ホモジネート ATPase に関する検討

筋肉中の ATPase は Ca^{++} によって賦活される myosin-ATPase¹⁷⁾ と $\text{Mg} \cdot$ によって賦活されるミトコンドリア ATPase^{18) 19) 20)} とから成っている。更に Ca^{++} 及び Mg^{++} はこの両酵素系に対して相反する作用を呈することも知られている。^{18) 19)} 然しながら著者の得た (5) における結果は Ca^{++} で賦活される酵素系が貯蔵末期で増加していることを示すので、筋肉中の ATPase 活性の変化を Ca^{++} , Mg^{++} 両イオンの存在下で検討してみた。ATPase の測定法は Ca^{++} 場合は前回と同様であるが、 Mg^{++} の場合は Ca^{++} の代りに Mg^{++} を 1mM 使

用して行った。又同時に pH の測定及びソーセージの製造を行い、ソーセージの結着性、保水性を感覚的に良好なもの、不良なものとして示した。なおこの実験は変化の速度を早める目的で、貯蔵温度において行なった。

第 1 表 (屠殺直後貯蔵した場合)

貯蔵した肉肉中の ATPase の変化及びそれから製造したソーセージの状態

屠殺後 経過時間	pH	ATPase (mgP/ min/g. prot.)		ソーセージの状態	
		Ca^{++} (10mM)	Mg^{++} (1mM)	保水性	結着性
0	6.4	0.89	0.51	+	+
6	5.8	0.77	0.52	±	+
12	5.8	0.70	0.49	±	—
24	5.9	0.43	0.27	—	—
48(腐敗臭)	6.2	0.59	0.55	+	+
96(腐敗臭)	7.6	0.53	0.95	+	+

第 2 表 (屠殺後一週間 4°C で貯蔵後
20°C で貯蔵した場合)

貯蔵時間	pH	ATPase (P/min /g. prot.)		ソーセージの状態	
		Ca^{++} (10mM)	Mg^{++} (1mM)	保水性	結着性
0	5.8	0.84	1.00	+	+
6	5.8	0.52	0.52	+	+
12	5.9	0.51	0.51	—	—
24	6.1	0.78	0.94	±	—
(微腐敗臭)	6.4	1.48	2.01	+	+
48(腐敗臭)	6.4	1.48	2.01	+	+
96(腐敗臭)	7.8	1.05	1.26	+	+

第 1 表及び第 2 表から判るように Mg^{++} で賦活されるミトコンドリア ATPase は貯蔵時間の増加と共に増大し、 Ca^{++} の存在下においてすら、その影響を及ぼしていることが判明する。殊に第 2 表はその顕著な例を示している。これはいわゆるミトコンドリアの latent ATPase がインキュベーションによって apparent ATPase に変化するため^{21) 22) 23)} と考えられ、 Ca^{++} を賦活剤として使用しても筋肉ホモジネートの myosin 系 ATPase を正しく測定することの困難さを指摘することができる。一方ソーセージの状態は少なくとも 24 時間以内は ATPase の減少即ち actomyosin の変性と正しく一致する (新鮮肉の場合、第 1 表) が、それ以後再び回復の徴候を示す。この現象はミトコンドリア ATPase の増大から考えて、筋肉組織の崩壊と恐らく関連があると想像されるが、少なくとも何等かの物理的方法をもって表示することができるまでは、はっきりしたことはいうことができない。

考 察

すでに述べたように、食肉加工の際のキュアリングは、その含塩量からみても、筋肉中の、Actomyosin 系を利用するものであることは疑う余地がない。従ってその製品の良否は、本蛋白質の変性の度合にかかわると考えられる。そこでキュアリング温度で、抽出したこの蛋白質を保存した結果、その物理化学的性質、すなわち酵素活性、粘度変化、硫酸塩析の結果が、極めて徐々にではあるが、この蛋白質の変性することを示し、その変性は、主として、分子中の myosin 部分であるということがはっきりしてきた。しかしながら、その変性の度合は軽微で、若し、製品の良否が、本蛋白質の変性によるとする著者の前提が正しければ、少くともキュアリング温度が適正であり、原料肉が新鮮である限り、食肉練製品の製造はかなり長時間可能であると考えられる。この考えを確認する目的で、酵素標品の水準から、筋肉組織標品の水準に移した実験では、筋肉中の複雑な酵素系の存在のため、酵素標品と同一手段では myosin B-ATPase の失活度合を推定できなかった。この結果は W. Partmann²⁴⁾ によって得られた結果とよく一致しており、彼はその原因を myosin の subunit の存在に帰している。然しながら著者がこの点に関して検討を加えた結果は、筋肉中の他の ATPase すなわちミトコンドリア ATPase の存在がこの主因をなすということを極めて明瞭に示している。この結果は、インキュベーションが筋肉中の Mg^{++} -ATPase を増大させるという報告²³⁾ ともよく一致している。

実的な問題としてこれらの化学的な現象をソーセージの状態と結びつける試みは成功しなかった。しかし少くとも 20°C にインキュベートした新鮮な筋肉の ATPase の失活とソーセージの良否は貯蔵後の24時間以内ではよく一致し、又キュアリング温度における長期間のソーセージの結着性、保水性の保持も観察されている。

このようなことから、貯蔵中の筋肉内部の、actomyosin の変化と、実際問題とを結びつけるためには、ここに述べられた基礎的な試験結果に、更に厳密な実的な試験結果を加え、その他に、筋肉組織標品の水準で正しく actomyosin 系の変性を示す方法を確立しなければならない。

要 約

筋肉構造蛋白質として最も重要な役割をはたしている actomyosin 系が食肉加工においても、その重要性を認められるにいたってきたので、実際製造時のキュアリング温度で本蛋白質を貯蔵して、その物理化学的諸性質の変化を検討した。その結果

(1) 抽出精製した myosin B の ATPase 活性及び粘度変化はよく一致した傾向で減少するが、その減少度合は軽微であった。又低 pH 値は減少度合を増大させた。

(2) (1)の結果から myosin B の変性は myosin の部分が主として変性するらしいと思われたので、硫酸塩析によって myosin B の成分を検討した結果分子中の myosin 部分が貯蔵によって減少することを認めた。

(3) 貯蔵した原料肉の ATPase の変化は貯蔵後暫らくの間は酵素標品の結果とよく一致するが、後次第に増加する傾向を示した。この原因については共存するミトコンドリア ATPase が保存中に極度に増大し Ca^{++} の存在下においてすら myosin-ATPase に影響を与えるという事実が示された。

(4) 上記の筋肉中の ATPase の測定と同時に実際にソーセージを製造し、実際問題との関連を検討したが、充分な結果は得られなかった。この点に関しては今後の課題として考察が行われた。終りに臨み、本実験に対し御助力をいただいた北海道大学農学部深沢利之氏に深謝の意を表する。なおこの研究は文部省科学試験研究費を受けて実施された。

文 献

1. P. Grau und O. Fleischmann, Die Fleischwirtschaft, **9**, 252 (1957)
2. R. Hamm, Die Fleischwirtschaft, **9**, 477 (1957)
3. B. R. Suri, Die Fleischwirtschaft, **9**, 551 (1957)
4. C. E. Swift, E. Wierbicki and C. G. Hankins, Food Technol., **8**, 339 (1954)
5. V. R. Chill, L. E. Kunkle E. Wierbicki and F. E. Deatherage, Food Technol., **8**, 506 (1956)
6. N. Arnold, E. Wierbicki and F. E. Deatherage, Food Technol., **10**, 245 (1956)
7. E. Wierbicki, L. E. Kunkle and F. E. Deatherage, Food Technol., **11**, 69 (1957)
8. E. Wierbicki, L. E. Kunkle and F. E. Deatherage, Food Technol., **11**, 74 (1957)
9. A. Szent-Györgyi, Chemistry of Muscular Contraction, 1st. ed. (1947)
10. S. E. Kerr, J. Biol. Chem., **139**, 121 (1941)
11. H. H. Weber and H. Portzehl, Advance in Protein Chemistry **7**, 207 (1952)
12. K. Yagi, J. Biochem (Japan) **44**, 337 (1957)
13. Y. Tonomura and A. T. Sasaki, Enzymologia, **18**, 111 (1957)
14. Y. Dorrien, Biochim. Biophys. Acta, **9**, 49

- (1952)
15. O. Snellmann and M. Tenow, *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 199 (1954)
16. O. H. Lowry, N. T. Rosebrogh, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. chem.*, **193**, 265 (1951)
17. M. N. Linbimova and V. A. Eugelhardt, *Biokhimiya*, **4**, 716 (1939)
18. W. W. Kielley and O. Meyerhof, *J. Biol. chem.*, **176**, 591 (1948)
19. J. B. Chappel and V. Perry, *Biochem. J.*, **55**, 586 (1953)
20. J. B. Marsh and N. Hangard, *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 204. (1957)
21. W. W. Kielley and R. K. Kielley, *J. Biol. Chem.*, **200**, 213 (1953)
22. H. A. Lardy and H. Wellmann, *J. Biol. Chem.*, **201**, 357 (1957)
23. H. G. Klemperer, *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 404 (1957)
24. W. Partmann, *Food Research*, **22**, 51 (1957)